

PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL CONJUGADO HPMA-RIBONUCLEASA A: UNA ALTERNATIVA COMO SISTEMA ACARREADOR DE FÁRMACOS.

Calef Sánchez-Trasviña^a, Karla Mayolo-Deloisa^a, Marco Rito-Palomares^b

^a Tecnológico de Monterrey, Escuela de Ingeniería y Ciencias, Monterrey, N.L. C.P.64849, ^b Tecnológico de Monterrey, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Monterrey, N.L. C.P.64710, mrito@tec.mx.

Palabras clave: HPMA, Ribonucleasa A, Conjugación.

Introducción. A lo largo de la historia los polímeros han sido utilizados en medicina para diferentes propósitos, entre ellos como acarreadores de fármacos. (1) Esta aplicación ha sido explotada recientemente ya que los polímeros incrementan la estabilidad y la solubilidad del fármaco además de aumentar la vida media en el torrente sanguíneo, lo cual se traduce en dosis más bajas y tratamientos más económicos. (2) El polímero poly(N-(2-hidroxipropil) metacrilamida (HPMA) ha sido recientemente estudiado como acarreador. (3) Esto debido a que, además de ser soluble en agua, no inmunogénico y biocompatible, posee grupos funcionales los cuales pueden ser utilizados para acarrear diferentes moléculas. (4) Es por esta razón que el HMPA se ha propuesto como acarreador de fármacos, sin embargo, la mayoría de las investigaciones se han concentrado en la conjugación de agentes quimioterapéuticos dejando de lado su uso para acarrear proteínas. (5) Por lo tanto, existen áreas de oportunidad en el proceso de obtención y purificación de conjugados HPMA-proteína.

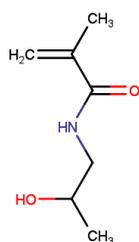


Fig. 1. Estructura del HPMA.

El objetivo de este trabajo es establecer las condiciones óptimas de la reacción de conjugación de HPMA con Ribonucleasa A (RNasa A) así como un proceso cromatográfico para su purificación.

Metodología. El proceso usado se muestra en la figura 2.

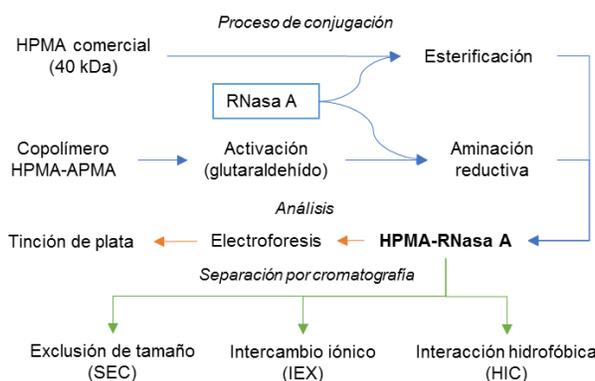


Fig. 2. Diagrama general de la metodología usada. El trabajo se dividió en tres etapas: conjugación, análisis y separación cromatográfica.

Resultados. La esterificación no fue viable para unir RNasa A al esqueleto polimérico mientras que la aminación reductiva si produjo conjugados HPMA-RNasa A aun cuando se usó un

rango de peso molecular amplio >10 kDa. Cuando se utilizó un rango de peso molecular entre 30-50kDa se obtuvo un mejor rendimiento de conjugación (Ver Figura 3). Debido a la baja homogeneidad del polímero no se pudo observar un pico bien definido que correspondiera al conjugado HPMA-RNasa A en los cromatogramas, sin embargo, si se observó un patrón diferente con respecto a los estándares. El intercambio catiónico no resultó factible debido a que el polímero se une al soporte, generando un perfil cromatográfico donde no es posible identificar el conjugado.

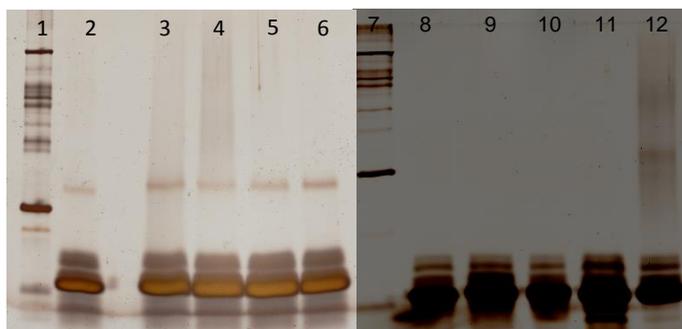


Fig. 3. Tinción de plata conjugados HPMA-RNasa A. 5 rangos de polímeros fueron probados: 10-30 (carril 3), 30-50 (carril4), 50-100 (carril 5), >100 (carril 6) y >10 kDa (carril 12). Reacciones de esterificación (carril 8-11). Estándar de RNasa (carril 2) y marcador de peso molecular (carril 1 y 7)

Conclusiones. La esterificación no fue favorecida debido al impedimento estérico, por otra parte, la activación con glutaraldehído proporcionó una extensión que permitió que la conjugación funcionará a través de una aminación reductiva. La naturaleza hidrofóbica y la carga negativa del copolímero permitieron separar el conjugado mediante HIC y AEX debido a que la RNasa A provoca cambios en estas propiedades superficiales. Este trabajo proporciona una ruta sencilla (3 pasos: copolimerización, activación y conjugación) de conjugación, así como un proceso cromatográfico eficiente.

Agradecimientos. Los autores agradecen el financiamiento otorgado de los grupos con enfoque estratégico de Omics Translacional (18ID00003) y Bioingeniería y Medicina Regenerativa (0020609M07). Calef Sánchez-Trasviña agradece a CONACyT por la beca otorgada (415543).

Bibliografía.

- Maitz M F & Pasut G. (2007) *Compr. Med. Chem II*. 8:1043-1068.
- Chytil P *et al.* (2018) *Macromol. Biosci.* 18:1-15.
- Pfister D & Morbidelli M. (2014) *J. Control. Release.* 180:134-149
- Lammers T & Ulbrich K. (2010) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62:119-121
- Mohammadpour R. *et al.* (2017). *Marcomol. Biosci.*17:1-15.

